

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003205

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-049123
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 June 2005 (16.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 5 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 4 9 1 2 3

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 4 9 1 2 3
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 明 治 製 菓 株 式 会 社

2 0 0 5 年 6 月 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	PM1785
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N
【発明者】	
【住所又は居所】	岐阜県岐阜市三田洞東5－6－1　岐阜薬科大学内
【氏名】	林　宏明
【発明者】	
【住所又は居所】	岐阜県岐阜市三田洞東5－6－1　岐阜薬科大学内
【氏名】	井上　謙一郎
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都文京区本郷7－3－1　東京大学大学院内
【氏名】	星野　雅輝
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都文京区本郷7－3－1　東京大学大学院内
【氏名】	渋谷　雅明
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都文京区本郷7－3－1　東京大学大学院内
【氏名】	海老塚　豊
【特許出願人】	
【識別番号】	000006091
【氏名又は名称】	明治製菓株式会社
【代表者】	佐藤尚忠
【電話番号】	03-3273-3357
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	008305
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲　1
【物件名】	明細書　1
【物件名】	要約書　1
【物件名】	図面　1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 が組み込まれた発現ベクターで形質転換した細胞。

【請求項 2】

請求項 1 記載の発現ベクターで形質転換した酵母。

【請求項 3】

シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 3 記載の発現ベクターで形質転換した細胞。

【請求項 5】

請求項 3 記載の発現ベクターで形質転換した酵母。

【請求項 6】

請求項 3 記載の発現ベクターで形質転換した受託番号 FERM P-19675 として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株。

【請求項 7】

請求項 1 記載の細胞から、シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 8】

請求項 2 記載の酵母を培養し、シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 の転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 9】

請求項 4 記載の細胞から、シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 10】

請求項 5 記載の酵母を培養し、シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 11】

請求項 6 記載の酵母を培養し、シトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法。

【請求項 12】

請求項 1 記載の細胞を用いてオレアナン型トリテルペンの 2 4 位を水酸化する方法。

【請求項 13】

請求項 2 記載の酵母を用いてオレアナン型トリテルペンの 2 4 位を水酸化する方法。

【請求項 14】

請求項 4 記載の細胞を用いて 2 4 位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法。

【請求項 15】

請求項 5 記載の酵母を用いて 2 4 位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法。

【請求項 16】

請求項 6 記載の酵母変異株を用いて 2 4 位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トリテルペン水酸化酵素

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物由来のソヤサポゲノール B 生合成に関与する酵素遺伝子を遺伝子工学的な手法を用いて形質転換した細胞、ならびにその細胞を利用することによりソヤサポゲノール B を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ソヤサポゲノール B (12-oleanene-3, 22, 24-triol) は、大豆種子より単離、構造決定されたオレアナン骨格を有するトリテルペン (Chem. Pharm. Bull. 24, p121-129, 1976, Chem. Pharm. Bull. 30, p2294-2297, 1982) (非特許文献 1、2) であり、その配糖体であるソヤサポニン はマメ科植物に広く分布している。これまでにソヤサポゲノール B に関しては、抗補体活性、血小板凝集抑制作用 (特開昭 61-37749) (特許文献 1)、抗腫瘍活性 (特開平 10-234396) (特許文献 2) および肝保護作用 (Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 85-88, 1997) (非特許文献 3) などが報告されており、医薬品もしくは医薬品原料としての有用性が期待されている。

【0003】

ソヤサポゲノール B の製造法としては、大豆種子に含有されるサポニンの糖鎖を加水分解したのち、ソヤサポゲノール B を精製する方法が知られているが、大豆種子に含有されているサポニンの割合は約 0.2% (薬学雑誌 104, 162-168, 1984) (非特許文献 4) と少なく、より効率的な製造法が求められている。

ソヤサポゲノール B の生合成前駆体である β -アミリンは、メバロン酸経路により生成した 2, 3-オキシドスクアレンが閉環することにより生合成され、その後、2 段階の水酸化反応を経てソヤサポゲノール B が生合成されると推定される。

【0004】

ソヤサポゲノール B と構造的に類似するソフォラジオール (12-oleanene-3, 22-diol) は槐花 (エンジュ) の成分として報告されている物質 (薬学雑誌 78, 1090-1094, 1958) (非特許文献 5) であるが、このソフォラジオールの 24 位を水酸化するとソヤサポゲノール B を生産することが可能である。

実際、カンゾウの培養細胞由来の水酸化酵素を利用して、ソフォラジオールの 24 位を水酸化することによる、ソヤサポゲノール B の製造法が開示されている。(W002/086142) (特許文献 3)

【0005】

【特許文献 1】 特開昭 61-37749 号公報

【特許文献 2】 特開平 10-234396 号公報

【特許文献 3】 国際公開 W002/086142 号公報

【非特許文献 1】 Chem. Pharm. Bull. 24, p121-129, 1976

【非特許文献 2】 Chem. Pharm. Bull. 30, p2294-2297, 1982

【非特許文献 3】 Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 85-88, 1997

【非特許文献 4】 薬学雑誌 104, 162-168, 1984

【非特許文献 5】 薬学雑誌 78, 1090-1094, 1958

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ソヤサポゲノール B の生合成前駆体である β -アミリンは、メバロン酸経路により生成した 2, 3-オキシドスクアレンが閉環することにより生合成され、その後、2 段階の水酸化反応を経てソヤサポゲノール B が生合成される。しかしながら、この反応に関与する水酸化酵素の遺伝子は明らかにされていなかった。そのため、水酸化酵素についての遺伝子工学的な利用が不可能であった。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、 β -アミリンからソヤサボゲノールBに至る生合成に関与するシトクロームP450型の酵素の遺伝子が、ソヤサボゲノールBの配糖体であるソヤサポニンを高生産するダイズのEST (Expression Sequence Tags) クローンや機能未同定クローンの中に含まれていると考え、ラノステロール欠損酵母変異株を用いて、これらダイズのクロンの機能解析を行った。解析を行ったクロンのうちシトクロームP450遺伝子CYP93E1 (GenBank Accession Number AF135485) を転写及び翻訳させた酵母において本来検出されないオレアナン型トリテルペンの24位の水酸化活性を検出したことから、シトクロームP450遺伝子CYP93E1がオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する酵素タンパクをコードしていることを明らかにした。

【0008】

従って、本発明の第1の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した細胞を提供することにある。

第2の態様はシトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した酵母を提供することにある。

第3の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターを提供することにある。

第4の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した細胞を提供することにある。

第5の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した酵母を提供することにある。

第6の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した受託番号FERM P-19675として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株を提供することにある。

第7の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した細胞から、シトクロームP450 CYP93E1遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法を提供することにある。

第8の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した酵母を培養し、シトクロームP450 CYP93E1遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法を提供することにある。

第9の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した細胞から、シトクロームP450 CYP93E1遺伝子及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法を提供することにある。

第10の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した酵母を培養し、シトクロームP450 CYP93E1遺伝子及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法を提供することにある。

第11の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した受託番号FERM P-19675として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株培養し、シトクロームP450 CYP93E1遺伝子及び β -アミリン合成酵素遺伝子を転写及び翻訳を誘導させ、ポリペプチドを生産する方法を提供することにある。

第12の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した細胞を用いてオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する方法を提供することにある。

第13の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1が組み込まれたベクターで形質転換した酵母を用いてオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する方法を提供す

ることにある。

第14の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した細胞を用いて24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法を提供することにある。

第15の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した酵母を用いて24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法を提供することにある。

第16の態様は、シトクロームP450遺伝子CYP93E1及び β -アミリン合成酵素遺伝子が組み込まれた発現ベクターで形質転換した受託番号FERM P-19675として寄託されているラノステロール合成酵素欠損酵母変異株を用いて24位が水酸化されたオレアナン型トリテルペンを製造する方法を提供することにある。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、オレアナン型トリテルペンの24位水酸化酵素の遺伝子塩基配列ならびにアミノ酸配列を明らかにすることができた。さらに、当該遺伝子を遺伝子工学的に利用することにより、遺伝子産物である酵素タンパクを大量に生産することができた。

また、生産された酵素タンパク質を用いて、トリテルペンの24位を水酸化することが可能となった。また当該遺伝子とアミリン合成酵素の遺伝子で形質転換された細胞を用いることにより、24位が水酸化されたトリテルペンを直接培養生産することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、CYP93E1 (GenBank Accession Number AF135485) 遺伝子の転写・翻訳産物を利用してオレアナン型トリテルペンの24位を水酸化する方法に関する。なお、同一機能を有し、配列番号8に記載の配列の相補体にハイブリダイズする限り、他のCYP93Eファミリーの遺伝子も本発明の範囲に含まれる。

【0011】

さらに、本発明は、CYP93E1遺伝子を発現するように形質転換した細胞に関する。宿主細胞の例としては、カイコ、酵母、ピキア、大腸菌等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0012】

形質転換する細胞の例としては、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77 (Kushiro, T. et al., Eur. J. Biochem., 256, 238-244, 1998) がある。上記CYP93E1に対応するcDNA及びエンドウ由来 β -アミリン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製) に組み込み、ラノステロール合成酵素を欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させることにより、24位が水酸化されたトリテルペンを直接、培養生産することが可能となる。

以下に本発明の実施例の概略を記載する。

【0013】

ダイズ由来のEST及び機能未同定でかつ全長の塩基配列が報告されているシトクロームP450クローンを7種 (GenBank Accession Number: AF135485、Y10491、Y10982、Y10983、Y10493、AF022459、及び、TIGR Accession Number: TC100921) 選択した。このうち、本活性を示したCYP93E1 (GenBank Accession Number AF135485) について、以下に記す。ダイズ芽生えより調製したmRNAから、RT-PCR法によりCYP93E1に対応するcDNAを増幅し、酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製) に組み込み、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77 (Kushiro, T. et al., Eur. J. Biochem., 256, 238-244, 1998) を形質転換し機能解析を行った。形質転換酵母の無細胞抽出液と β -アミリン

を反応させ、生成物をアセチル化し、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。

【0014】

同様に、形質転換酵母の無細胞抽出液とソフォラジオールを反応させ、生成物をアセチル化し、GCMSで解析した。その結果、トリアセチルソヤサボゲノールBを検出した。

【0015】

形質転換酵母の培養に β -アミリンを投与し、反応後、細胞を収穫した。脂溶性画分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。

【0016】

上記CYP93E1に対応するcDNA及びエンドウ由来 β -アミリン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製) に組み込み、ラノステロール合成酵素を欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させた。

【0017】

形質転換酵母を培養し、細胞を収穫した。脂溶性画分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。

【0018】

同様に、上記CYP93E1に対応するcDNA及びシロイヌナズナ由来混合トリテルペン合成酵素遺伝子を酵母発現ベクターpESC-ERA (Stratagene社製) に組み込み、ラノステロールシンターゼを欠いた酵母GIL77を形質転換し、2種の遺伝子を共発現させた。

【0019】

形質転換酵母を培養し、細胞を収穫した。脂溶性画分を抽出し、アセチル化後、GCMSで解析した。その結果、3, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンを検出した。他のジアセトキシトリテルペンは検出限界以下であった。

【0020】

以上の結果、該酵母において本来検出されないソフォラジオール及び β -アミリンの24位に対する水酸化活性が認められたことから、CYP93E1 (GenBank Accession Number AF135485) はオレアナン型トリテルペンの24位水酸化酵素をコードする遺伝子であると明らかにすることができた。一方、同様に活性を調べた他の6種のP450遺伝子においては、本活性を検出することはできなかった。

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0021】

(1) ダイズ芽生えのcDNAの調製

水浸14日後のダイズ(早生枝豆、アタリヤ農園)幼葉から、フェノール/クロロホルム法により全RNAを抽出した。これを鋳型として、逆転写酵素SuperscriptII (GIBCO BRL製) と、配列番号1に示すプライマーを用いてcDNAを調製した。

【0022】

(2) CYP93E1の増幅

上記(1)で調製したcDNAを鋳型とし、配列番号2と3に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に相当する箇所のオリゴDNAをプライマーとして、アニール温度65℃でPCR(30サイクル、宝酒造社製Ex Taq DNAポリメラーゼ)を行い、CYP93E1 (AF135485) の全長クローンを得た。

【0023】

(3) pESC-CYP93E1の構築及び形質転換酵母の作成

上記(2)で得られた全長クローンを制限酵素SpeIとClaIで処理し、酵母発現ベクターpESC-URA (Stratagene社製) のSpeIとClaIサイトに組み込んだ。これをpESC-CYP93Eとした。pESC-CYP93Eを、酵母I

NVSC 2株 (Invitrogen社) に Frozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research 社) を用いて導入した。

【0024】

(4) *in vitro* 酵素活性試験

グルコースの代わりに2%ラフィノースを含むSC-U培地 (Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990) 20 ml に形質転換酵母を植菌し、30℃、220 rpm で18時間培養した。ヘミン (最終濃度13 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とガラクトース (最終濃度2%) を加え、同条件でさらに20時間培養した。遠心により細胞を収穫し、2 ml のスクリーブバイアルへと移し、100 μl の抽出緩衝液 (pH 7.5 の50 mM リン酸-カリウム緩衝液に10% スクロース、1 mM EDTA 及び14 mM の2-メルカプトエタノールを加えたもの) を加え、再懸濁した。ここに希塩酸にて洗浄した0.4-0.6 mm 径のガラスビーズ (井内盛栄堂) を適量加えた。4℃に冷却し、MINI-BEADBEADER (BIOSPEC 社) を用いて細胞の破砕を行った。ここにさらに400 μl の抽出緩衝液を加えよく攪拌した後、4℃に冷却しながら3500 g で5分間遠心分離を行い、約400 μl の上清を粗酵素液として回収した。それに対し、100 μl の濃縮反応緩衝液 (抽出緩衝液に10 mM NADPH、75 mM グルコース-6-リン酸 (G6P)、2.5 U/ml グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) を加えたもの) および5 μl の10 mM の β -アミリン・メタノール溶液を加えた。これを30℃、6時間反応させた。12 N 塩酸10 μl を添加した後、500 μl の酢酸エチルを用いて脂溶性成分の抽出を2回行い濃縮した。20 μl のピリジン及び無水酢酸を加えて一晩放置することにより抽出物のアセチル化を行った。これに200 μl の50% メタノール水溶液を加えて反応を停止し、200 μl のヘキサンを用いて抽出を2回行い濃縮した (1)。対照実験として、2) pESC-URA を用いた形質転換体由来の粗酵素液を用いたもの、3) 基質である β -アミリンを加えなかったもの、4) 100℃、5分で熱処理した粗酵素液で反応を行ったもの、5) pESC-CYP93E1 のGAL1 プロモーター抑制のためガラクトースの代わりに同量のグルコースを加えたものについても同様の手法でサンプルを調製した。これを20 μl のヘキサンに溶解し、1 μl をGC-MS 分析 (島津製作所 ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010, カラム: RESTEK 社 Rtx-5MS, 内径0.25 mm 膜厚0.25 μm 長さ30 m, 昇温プログラム: 230℃で3分間ホールド、10℃/分で昇温、330℃で8分間ホールド) に供した。全イオンモニター (TIM)、及び、 $m/z = 218$ (3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのベースピーク) のマスクロマトグラムで生成物の有無を解析した。TIMでは、 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの生成は認められなかった (結果未記載)。しかしながら、 $m/z = 218$ のマスクロマトグラムにおいて 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンが、1) の条件で観測された (図1)。この結果よりCYP93E1 翻訳産物は β -アミリンへの24位水酸化活性を有することを確認した。

次に、ソフォラジオールに対する反応性を検討するために、ソフォラジオール (5 μl 10 mM) を基質として、同様に酵素反応を行い、上記と同様にGCMS 解析を行った。上記の1) の反応条件の生成物のマスクロマトグラム解析 ($m/z = 216$ トリアセチルソヤサボゲノールBのベースピーク) において、トリアセチルソヤサボゲノールBのピークが観測された (図2)。これより、CYP93E1 翻訳産物は、 β -アミリンのみならず、ソフォラジオールに対しても、24位水酸化活性を有することが明らかとなった。

【0025】

(5) *in vivo* 酵素活性試験

グルコースの代わりに2%ラフィノースを含むSC-U培地20 ml に形質転換酵母を植菌し、30℃、220 rpm で18時間培養した。ヘミン (最終濃度13 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とガラクトース (最終濃度2%) を加え、さらに基質として10 μl の10 mM の β -アミリン・メタノール溶液を加えた。酸素を供給するために、ファルコンチューブの上部を

綿栓で封じ、無菌的かつ好氣的にさらに24時間培養した。遠心により細胞を収獲し、2 mlのスクリーバイアルへ移した。これに250 μ lの40%水酸化カリウム水溶液及び250 μ lのメタノールを加え、十分に攪拌し、100℃、5分で熱処理した。500 μ lのヘキサンを用いて脂溶性成分の抽出を2回行い濃縮した。20 μ lのピリジン及び無水酢酸を加えて一晩放置することにより抽出物のアセチル化を行った。これに200 μ lの50%メタノール水溶液を加えて反応を停止し、200 μ lのヘキサンを用いて抽出を2回行い濃縮した(1))。対照実験として、2) pESC-URAを用いた形質転換体を用いたもの、3) 基質である β -アミリンを加えなかったもの、4) pESC-CYP93E1のGAL1プロモーター抑制のためガラクトースの代わりに同量のグルコースをくわえたものについても同様の手法でサンプルを調製した。これを10 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lを(4)における条件と同条件でGC-MS分析に供した(条件は(4)の実験と同じ)。1)の条件において3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのピークがTIMで観測され(図3-1)、かつ、そのピークのMS開裂パターンは標品と一致した(図3-2)。TIMのピーク面積比による定量結果から、本条件と同一の条件で1 L培養した場合(約2 mgの β -アミリンを投与)、数 μ gの3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンが得られることになる。

【0026】

(6) 発現プラスミド pESC-PSYの構築

エンドウ由来の β -アミリン合成酵素PSY (AB034802、Eur. J. Biochem. 267, 3543-3460, 2000)を組み込んだプラスミドを鋳型に、配列番号4、5に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に対応するオリゴDNAをプライマーとして、アニール温度58℃でPCR(30サイクル、宝酒造社製Ex Taq DNAポリメラーゼ)を行い、Sal I及びNhe IサイトをそれぞれN末、C末に導入したPSYの断片を得た。これをpESC-URAのSal IおよびNhe Iサイトに導入し、pESC-PSYを作成し、既知の手法(Eur. J. Biochem. 267, 3543-3460, 2000)により β -アミリン合成酵素活性を確認した。

【0027】

(7) 発現プラスミド pESC-PSY-CYP93E1の構築および形質転換酵母の作成

pESC-PSY及びpESC-CYP93E1をSal I及びCla Iで消化した。得られたPSYを含む断片とCYP93E1を含む断片を連結することにより、PSYとCYP93E1の共発現プラスミドpESC-PSY-CYP93E1を構築した。これを酵母GIL77株にFrozen-EZ Yeast Transformation IIを用いて導入し、形質転換体を得た。

【0028】

(8) PSYおよびCYP93E1の共発現実験

炭素源として2%グルコースを含むSC-U培地20 mlにヘミン(最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール(最終濃度20 μ g/ml)、Tween 80(最終濃度5 mg/ml)を加えた培地へ形質転換した酵母を植菌し、30℃、220 rpmで1日半培養した。培地を炭素源として2%ガラクトースを含むSC-U培地20 mlにヘミン(最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール(最終濃度20 μ g/ml)、Tween 80(最終濃度5 mg/ml)を加えた培地へと交換した後、さらに30℃、220 rpmで1日培養した。細胞をpH 7.5の50 mMリン酸-カリウム緩衝液へ移し、ヘミン(最終濃度13 μ g/ml)及びグルコース(最終濃度3%)を加え、さらに30℃、220 rpmで1日インキュベートした。(4)における実験手法と同様にアセチル化したGC-MS分析用サンプルを調製した。対照実験として、pESC-URAを用いた形質転換体、pESC-PSY、pESC-CYP93E1を用いた形質転換体を用いた形質転換体についても同様の手法でサンプルを調製した。これを1000 μ lのヘキサンに溶解し、1 μ lをGC-MS分析に供した(条件は(4)実験に同じ)。図4に示すようにpESC-PSY-CYP93E1形質転換酵母を用いた場合のみ3 β , 24-ジアセト

キシ-12-オレアネンに対応するピークがT I Mで観測された。ピーク面積比による定量解析の結果、本条件で1 L培養した場合、数百 μ gの3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンが得られることになる。

【0029】

(9) G I L 7 7 / p E S C - P S Y - C Y P 9 3 E 1 の大量培養 (1 L)

500 ml の三角フラスコに250 ml の炭素源として2%ラフィノースを含むS C - U 培地250 ml にヘミン (最終濃度13 μ g/ml)、エルゴステロール (最終濃度20 μ g/ml)、T w e e n 8 0 (最終濃度5 mg/ml) を加えた培地へ形質転換した酵母を植菌した。これを4本作成し、全量で1 L の培養を行った。30℃、220 rpm で20時間培養したのち、ガラクトースを加え (最終濃度2%)、さらに30℃、220 rpm で20時間培養した。細胞全量を100 ml のpH 7.5 の50 mM リン酸-カリウム緩衝液へ移し、ヘミン (最終濃度13 μ g/ml) 及びグルコース (最終濃度3%) を加え、さらに30℃、220 rpm で1日インキュベートした。

【0030】

(10) G I L 7 7 / p E S C - P S Y - C Y P 9 3 E 1 の1 L 培養から生成物の単離

(9) で得た培養から遠心により細胞を収穫し、50 ml の40%水酸化カリウム水溶液及び50 ml のメタノールを加え、1時間加熱還流を行った。50 ml のヘキサンを用い脂溶性画分の抽出を行った。ヘキサン画分は50 ml の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で3回十分に洗浄した。この操作を3回繰り返し抽出を行い、約23 mg の脂溶性画分を得た。

これを2段階のシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。まず、上記脂溶性画分をベンゼンに溶解し、シリカゲルF C - 40 (4 g、和光純薬)、ヘキサン・酢酸エチル溶媒系を用いて精製した。次に、当該画分をシリカゲルF C - 40 (2 g) 及びベンゼン・酢酸エチル溶媒系を用いて精製し、0.55 mg の3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンを得た。

【0031】

(11) 発現プラスミド p E S C - Y U P 4 3 の構築

シロイヌナズナ由来の β -アミリンを含む9種のトリテルペンを与える多機能型トリテルペン合成酵素Y U P 4 3 (T e t r a h e d r o n l e t t . 41, 7705-7710, 2000) を組み込んだプラスミドを鋳型とし、配列番号5、6に示す、ポリペプチドのN末端とC末端に相当するオリゴDNAをプライマーとして、P C R (アニール温度58℃、30サイクル、宝酒造社製E x T a q DNAポリメラーゼ) を行い、S a l I 及びN h e I サイトをそれぞれN末、C末に含むY U P 4 3 の断片を得た。これをp E S C - U R A のS a l I およびN h e I サイトに導入し、p E S C - Y U P 4 3 を作成し、既知の手法 (T e t r a h e d r o n l e t t . 41, 7705-7710, 2000) により多機能型トリテルペン合成酵素活性を確認した。

【0032】

(12) 発現プラスミド p E S C - Y U P 4 3 - C Y P 9 3 E 1 の構築および形質転換酵母の作成

p E S C - Y U P 4 3 及びp E S C - C Y P 9 3 E 1 をS a l I 及びC l a I で消化した。Y U P 4 3 を含む断片とC Y P 9 3 E 1 を含む断片を連結することによりY U P 4 3 とC Y P 9 3 E 1 を共発現させるプラスミドp E S C - Y U P 4 3 - C Y P 9 3 E 1 を構築した。これを酵母G I L 7 7 株にF r o z e n - E Z Y e a s t T r a n s f o r m a t i o n I I を用いて導入し、形質転換体を得た。

【0033】

(13) Y U P 4 3 およびC Y P 9 3 E 1 の共発現実験

(8) と同様の手法により、p E S C - U R A、p E S C - Y U P 4 3、p E S C - C Y P 9 3 E 1、p E S C - Y U P 4 3 - C Y P 9 3 E 1、それぞれによる形質転換体についてサンプルを調製した。これらを1000 μ l のヘキサンに溶解し、1 μ l をG C - M S 分析に供した (条件は (4) 実験に同じ)。図6に示すようにp E S C - Y U P 4 3 - C

YP 9 3 E 1 形質転換酵母を用いた場合のみ、TIMにおいて 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンのピークが観測された。YUP 4 3における β -アミリンの生産量がPSYのものより低いため、 3β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの産生量はpESC-PSY-CYP 9 3 E 1 形質転換体と比較して低下した。一方、他のトリテルペン（ルペオール、ブチロスペルモール、チルカラジエノール、タラキサステロール、シェードタラキサステロール、パウレエレノール、 α -アミリン、マルチフロレノール）の水酸化体と考えられるピークは検出限界以下であった。

【産業上の利用可能性】

【0034】

本発明により、オレアナ型トリテルペンの24位を水酸化する酵素を遺伝子工学的に取り扱うことが可能となった。従って、当該酸化酵素遺伝子を組み込んだ細胞を用い、例えば酵母などによる酸化酵素の生産、酸化反応の利用、植物トリテルペンの微生物生産などに利用可能である。また、酸化酵素の遺伝子を植物に組み込むことによりソヤサボゲノールなどのトリテルペンの生産を増大させる等、農業分野での利用可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】 CYP 9 3 E 1 翻訳産物の β -アミリンの24位水酸化活性 (in vitro)

【図2】 CYP 9 3 E 1 翻訳産物のソフォラジオール24位水酸化活性 (in vitro)

【図3-1】 CYP 9 3 E 1 翻訳産物の β -アミリンに対する24位水酸化活性 (in vivo)

【図3-2】 CYP 9 3 E 1 翻訳産物の β -アミリン24位水酸化活性 (in vivo)

【図4】 CYP 9 3 E 1 と β -アミリン合成酵素 (PSY) の共発現による 3β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産

【図5】 GIL 7 7 / pESC-PSY-CYP 9 3 E 1 の1L培養から得た生成物の $^1\text{H-NMR}$

【図6】 CYP 9 3 E 1 と多機能型トリテルペン合成酵素 (YUP 4 3) の共発現による 3β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産

【図7-1】 CYP 9 3 E 1 の塩基配列

【図7-2】 CYP 9 3 E 1 の推定アミノ酸配列

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha LTD.

<120> Triterpene hydroxylase

<130> PM1785

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for cDNA

<400> 1

gactcgagtc gacaacgatt tttttttttt tt

32

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer sequence for CYP93E1

<400> 2

aaacactagt atgctagaca tcaaaggcta c

31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for CYP93E1

<400> 3

ttcaatcgat tcaggcagcg aacggagtga a

31

<210> 4

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for PSY

<400> 4
cttcgtcgac aagatgtgga ggttgaagat a 31

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for PSY

<400> 5
gtccgctagc tcaaggcaaa ggaactcttc t 31

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for YUP43

<400> 6
tagggtcgac attatgtgga agttgaagat a 31

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for YUP43

<400> 7
taaggctagc ctaaagatct tgatgagttg c 31

<210> 8
<211> 1542
<212> DNA

<213> Soybean

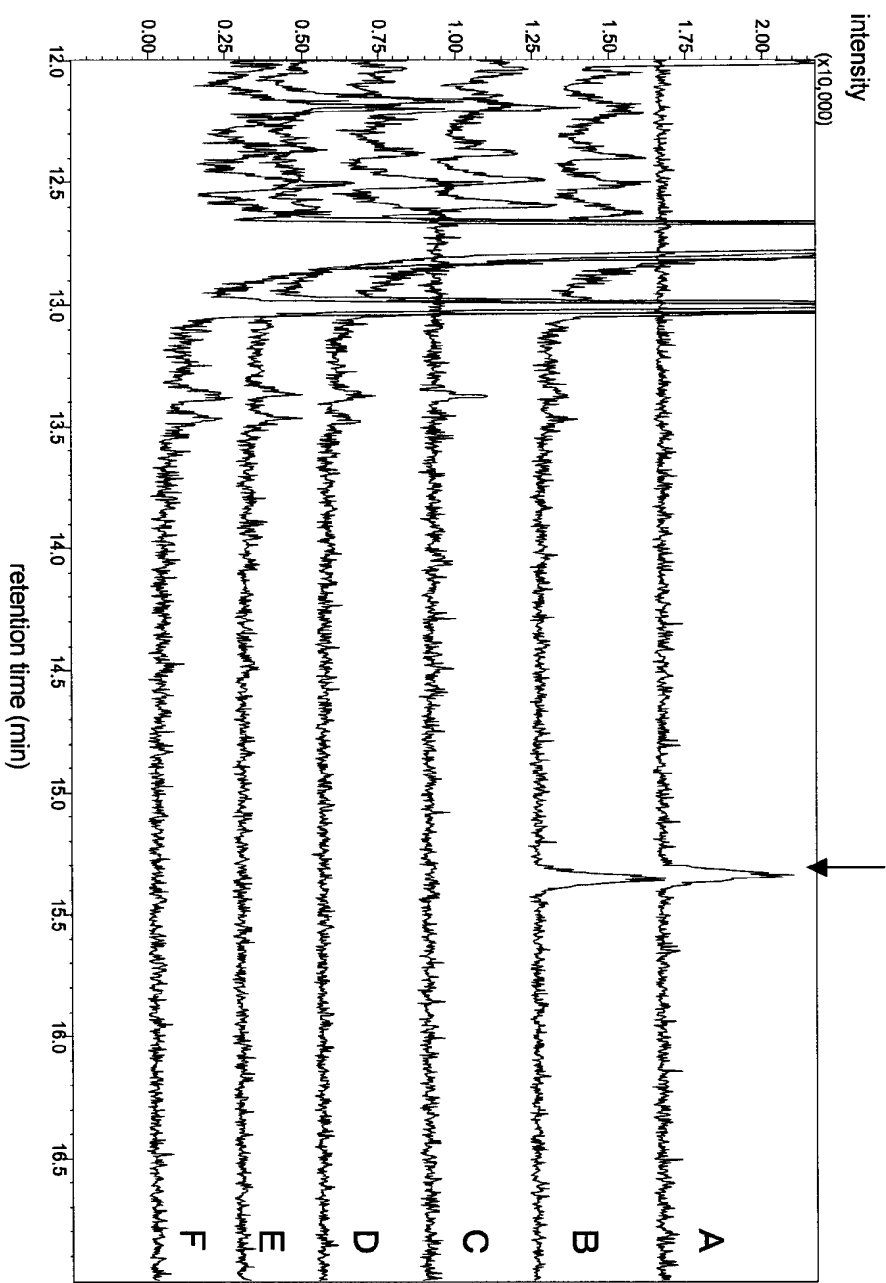
<400> 8

atgctagaca tcaaaggcta cctcgtaetc ttcttlectat ggttcatatc aaccattctg	60
atacgttcca tcttcaagaa accacagcgt ctaagactcc caccgggtcc tccaatttca	120
gtacccttgc tgggacacgc gccatatetc cgttcaactgc tccaccaagc cttgtacaag	180
ctatcactgc gctatggacc cttgatccac gtcatgatcg gttcgaagca cgtggtggtg	240
gcgtcgtcgg cggagacggc caagcagatc ctcaaaacct cggaggaggc attctgcaac	300
cgtcccttaa tgatagcgag cgagagccta acctacggcg cggcggacta cttcttcatc	360
ccctacggca catactggcg gttcctgaag aagctctgca tgacggagct tctgagcggg	420
aagaccctgg agcatttctg gagaatccgc gagagcgagg tggaggcggt cctcaagaga	480
atgatggaga tttcaggcaa tggaaattac gaggtggtga tgaggaagga gctcataacg	540
cacacgaata acatcatcac gaggatgata atggggaaga agagtaatgc ggaaaacgat	600
gaggtagcca ggttgaggaa ggtggtgagg gaggtcgggg agttgcttgg ggcgtttaac	660
ttgggggatg ttattggggt catgaggcct ttggatctgc aagggttttg gaagaagaac	720
atggaaactc accacaaggt ggatgcgatg atggagaagg tgttgaggga gcatgaggag	780
gctagggcta aggaagatgc tgactctgat aggaagaagg atctttttga tattttgttg	840
aaectcattg aagctgatgg tgctgacaat aagctcacta gagagagtgc caaagccttt	900
gctctggaca tgttcatcgc cggcacaaac ggccccgcaa gcgtcctaga gtggtcactg	960
gcggagctgg tgagaaaccc ccacgttttc aagaaggcaa gagaagagat tgagtcagtg	1020
gtaggcaaag aaaggctggt caaagaatca gacattccca acctaccata cctacaagca	1080
ttgctgaagg aaaccctaag gctgcacccg ccaaccccaa tattcgcaag agaagccatg	1140
cgaacatgcc aggttgaagg ctacgacatt ccggaaaatt ccaactattt gatcagcaca	1200
tgggccattg gtagggatcc aaattactgg gatgacgcac tcgagtacaa gccggagagg	1260
ttcttgttct ccgacgaccc gggcaagagc aagattgacg tgagggggca gtactatcag	1320
ctcctgccct ttgggagcgg gagaagaagc tgccccggag cctcgctagc gttgcttgtc	1380
atgcaagcaa cgctagcgag tttgatccag tgcttcgact ggatcgttaa tgatggtaaa	1440

a a c c a t c a t g t t g a c a t g t c t g a g g a a g g g a g g g t g a c t g t g t t t t t g g c c a a g c c a c t c 1500

a a g t g c a a g c c t g t t c c g c g t t t c a c t c c g t t c g e t g c c t g a 1542

図 1 CYP93E1 翻訳産物の β -アミリンの 24 位水酸化活性 (*in vitro*)



生成物をアセチル化後 GC/MS で解析。m/Z=218 をモニターしたマスクロマトグラム

A ; 3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレフィンの標品

B ; PESC-CYP93E1 による形質転換酵母から調製した粗酵素液と β -アミリンを NADPH 再生システム共存下反応させて得られる生成物

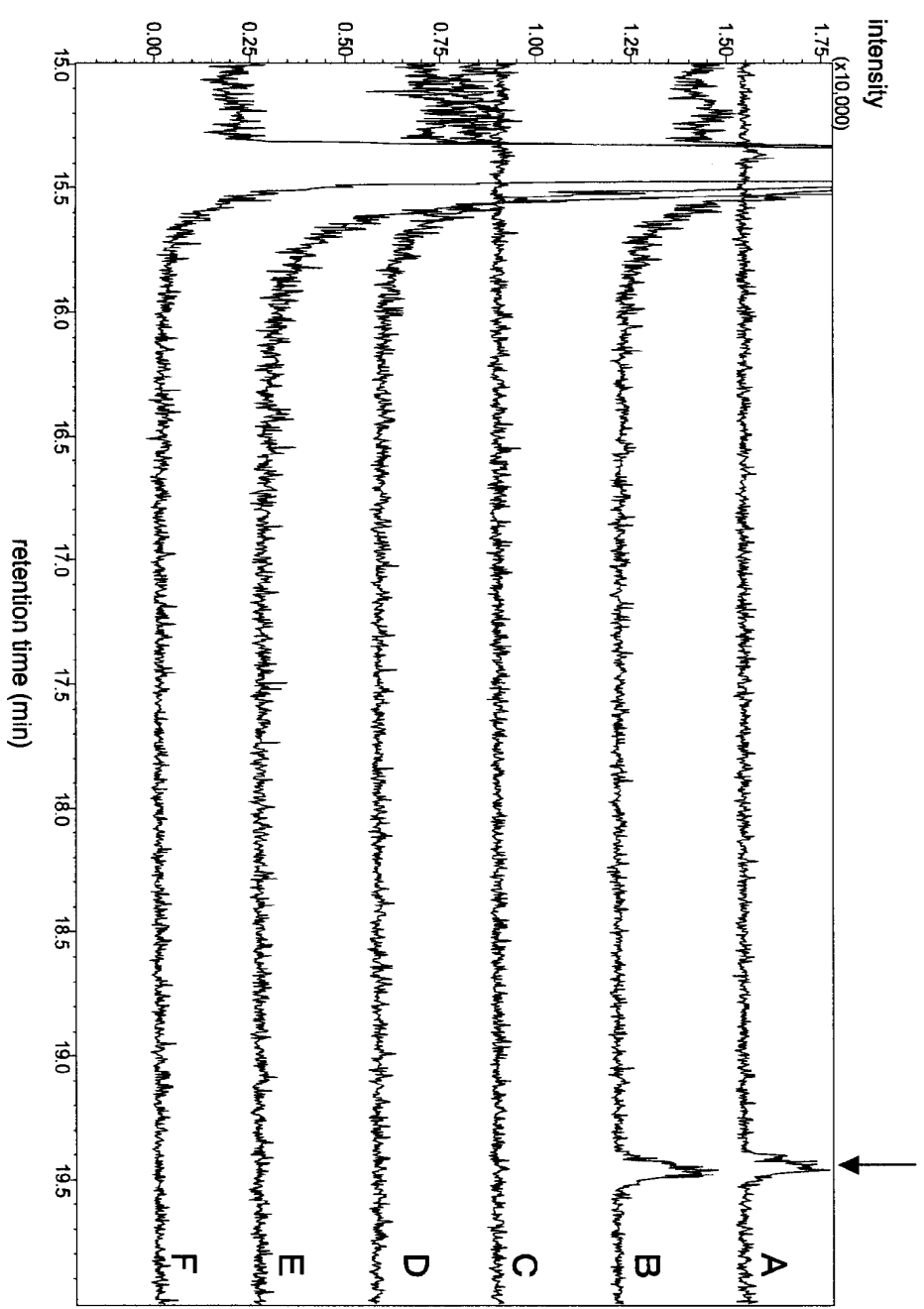
C ; B の反応系から β -アミリンを除いて反応させた生成物

D ; B の反応において、熱変性させた粗酵素液を用いて反応させた生成物

E ; PESC-CYP93E1 による形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他は B と同一条件。

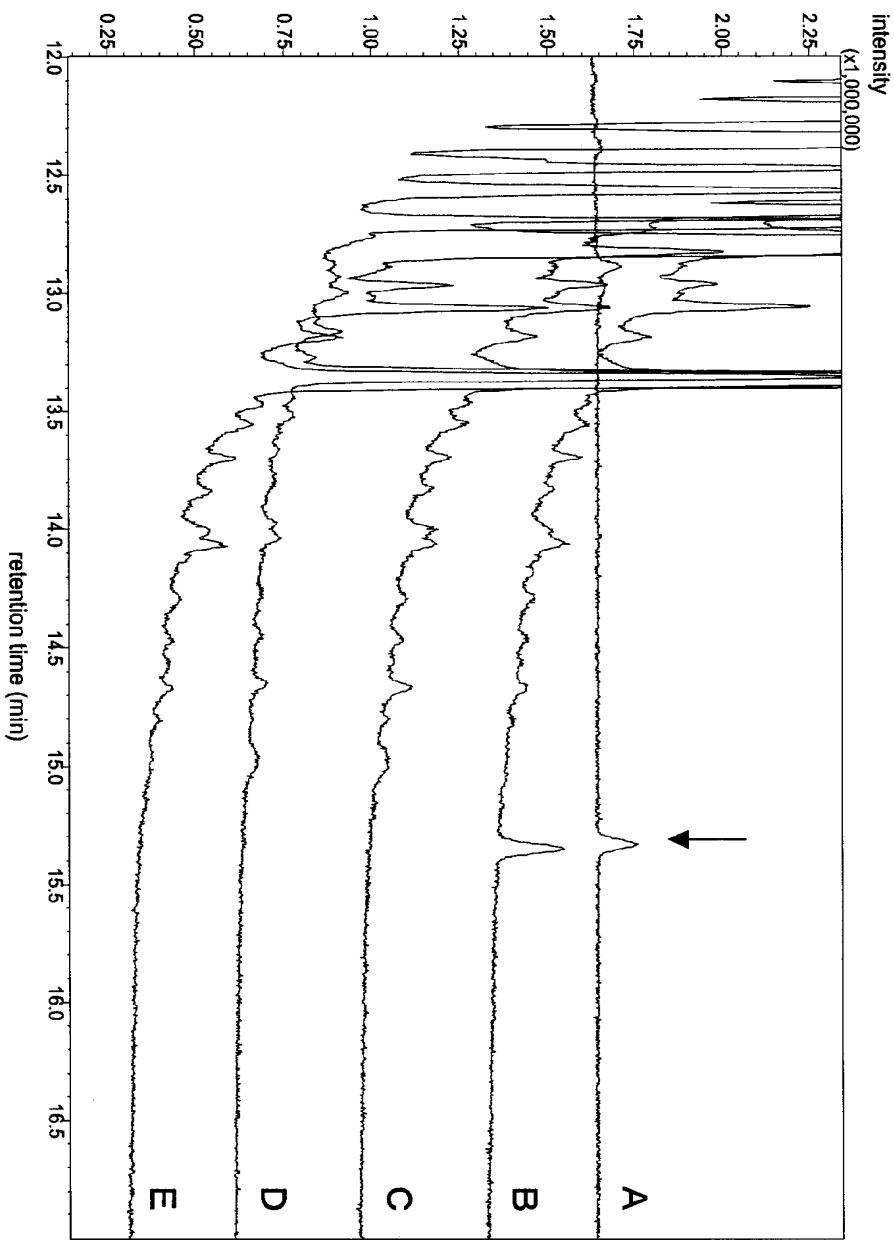
F ; ボイドベクター PESC-URA による形質転換酵母から調製した粗酵素液を使用。他は B と同一条件。

図 2 CYP93E1 翻訳産物のソフオラジオール24位水酸化活性 (*in vitro*) .



生成物をアセチル化後GC MSで解析。m/Z=216をモニターしたマスクロマトグラム
A ; トリアセチルソフオラジオールBの標品
B ; PESC-CYP93E1による形質転換酵母から調製した粗酵素液とβ アミリンをNADPH再生システム共存下反応させて得られた生成物
C ; Bの反応系からソフオラジオールを除いて反応させた生成物
D ; Bの反応において、熱変性させた粗酵素液を用いて反応させた生成物
E ; PESC-CYP93E1による形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他はBと同一条件。
F ; ポイドベクターPESC-URAによる形質転換酵母から調製した粗酵素液を使用。他はBと同一条件。

図 3-1 CYP93E1 翻訳産物の β -アミリンに対する 24 位水酸化活性 (*in vivo*)



生成物をアセチル化後GC-MSで解析。T1Mによるクロマトグラム。

A ; 3 B, 24-ジアセトキシ-12-オレファネソンの標品 (20 pmol)

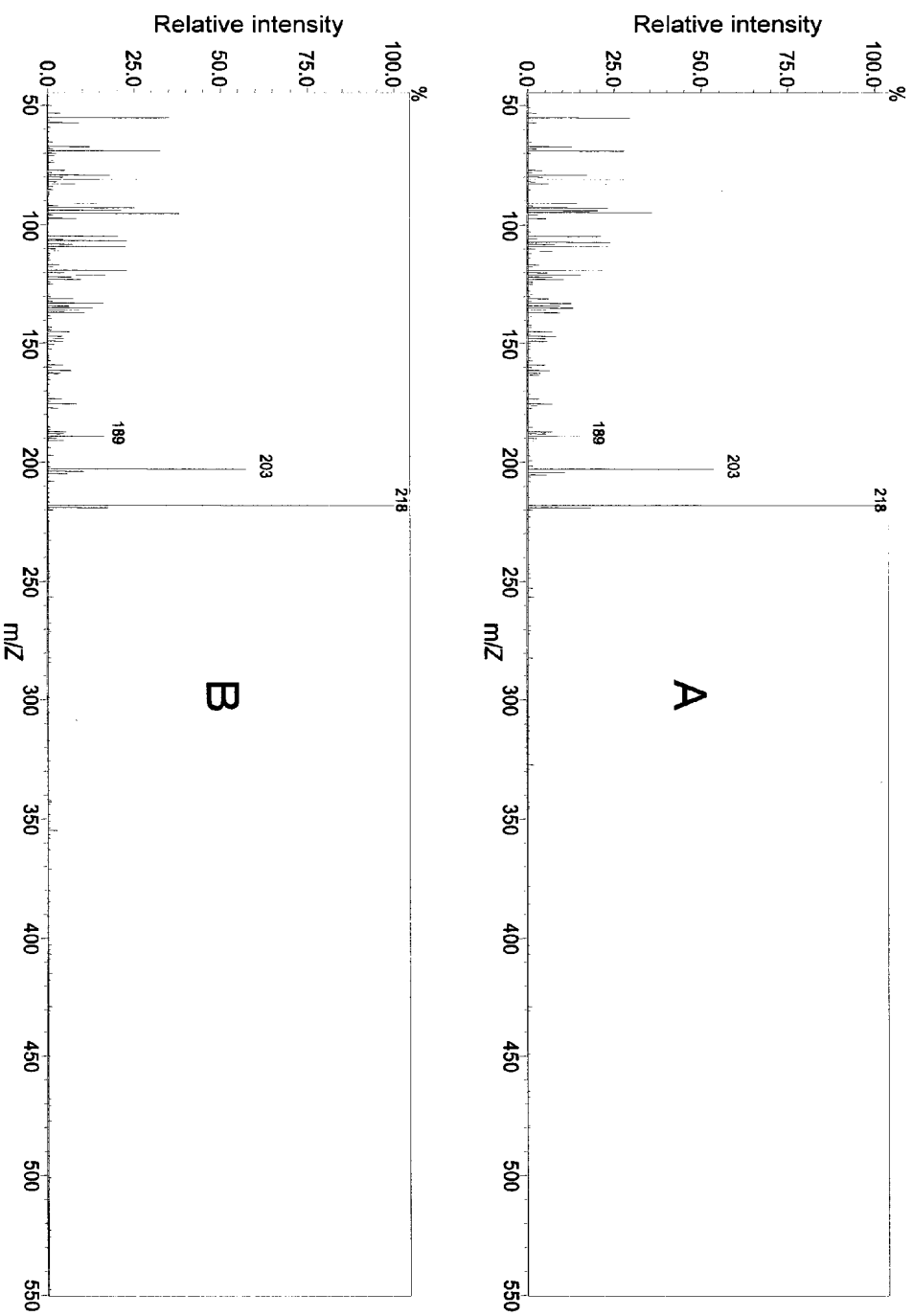
B ; pESC-CYP93E1 による形質転換酵母に β -アミリンを投与して得られた生成物

C ; β -アミリンを投与しない場合。他はBと同じ。

D ; 形質転換酵母を、グルコースを添加して培養。他はBと同一条件。

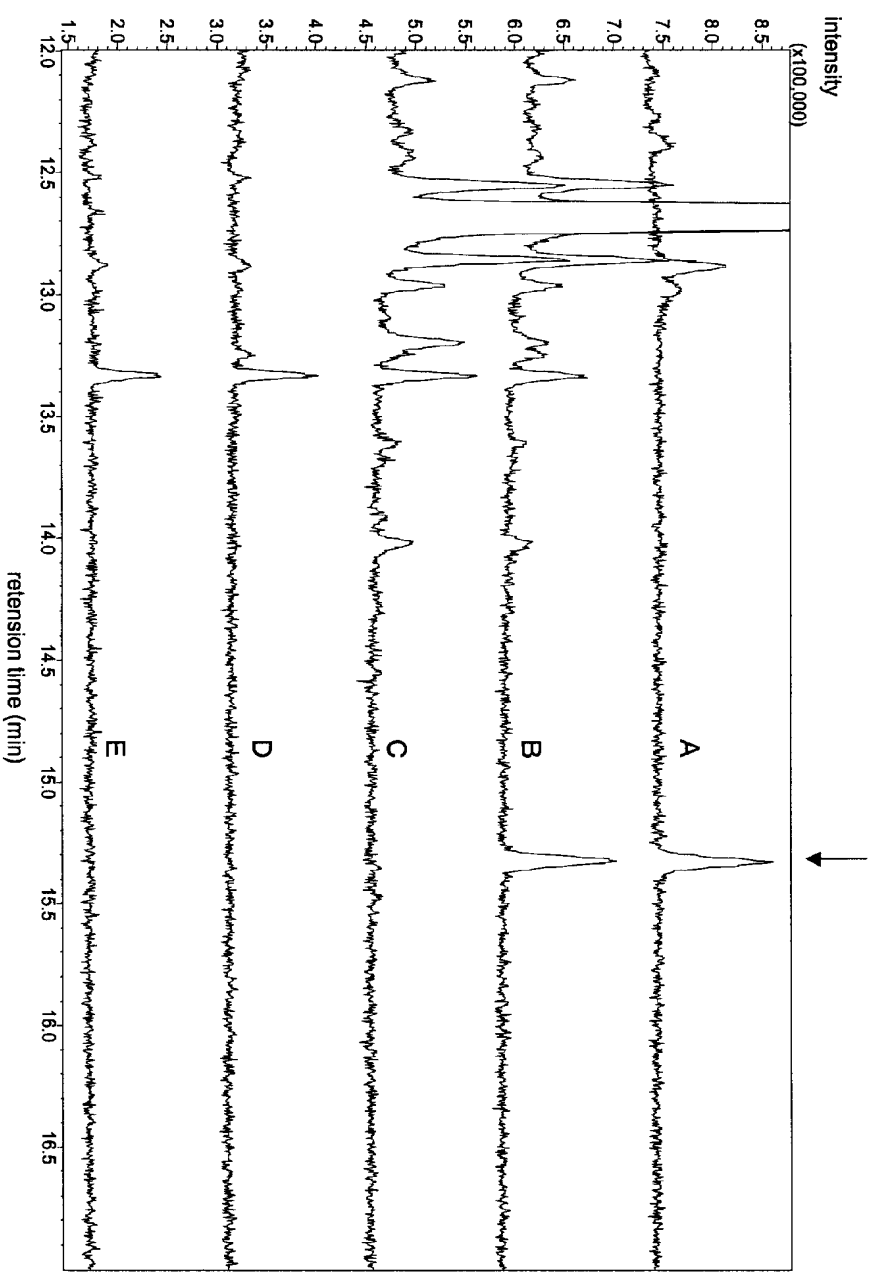
E ; ボイトベクターpESC-URAによる形質転換酵母 β -アミリンを投与。他はBと同一条件。

図 3-2 CYP93E1 翻訳産物の β -アミリン 24 位水酸化活性 (*in vivo*)



A ; 図 3-1 の B において検出した保持時間 15.35 分のピーク
 B ; 図 3-1 の A (3 β , 24-ジアセトキシ-12-オレアネノの標品)

図4 CYP93E1と β -アミリン合成酵素 (PSY) の共発現による 3β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産



各形質転換酵母 (GIL77) から得られた脂溶性画分をアセチル化し、GC/MS解析。TIMによるクロマトグラム。

A; 3 β , 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの標品 (20 pmol)

B; pESC-PSY-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物

C; pESC-PSYによる形質転換酵母の抽出物

D; pESC-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物

E; pESC-URAによる形質転換酵母の抽出物

図5 GIL77/pESC-PSY-CYP93E1の1L培養から得た生成物の¹H NMR

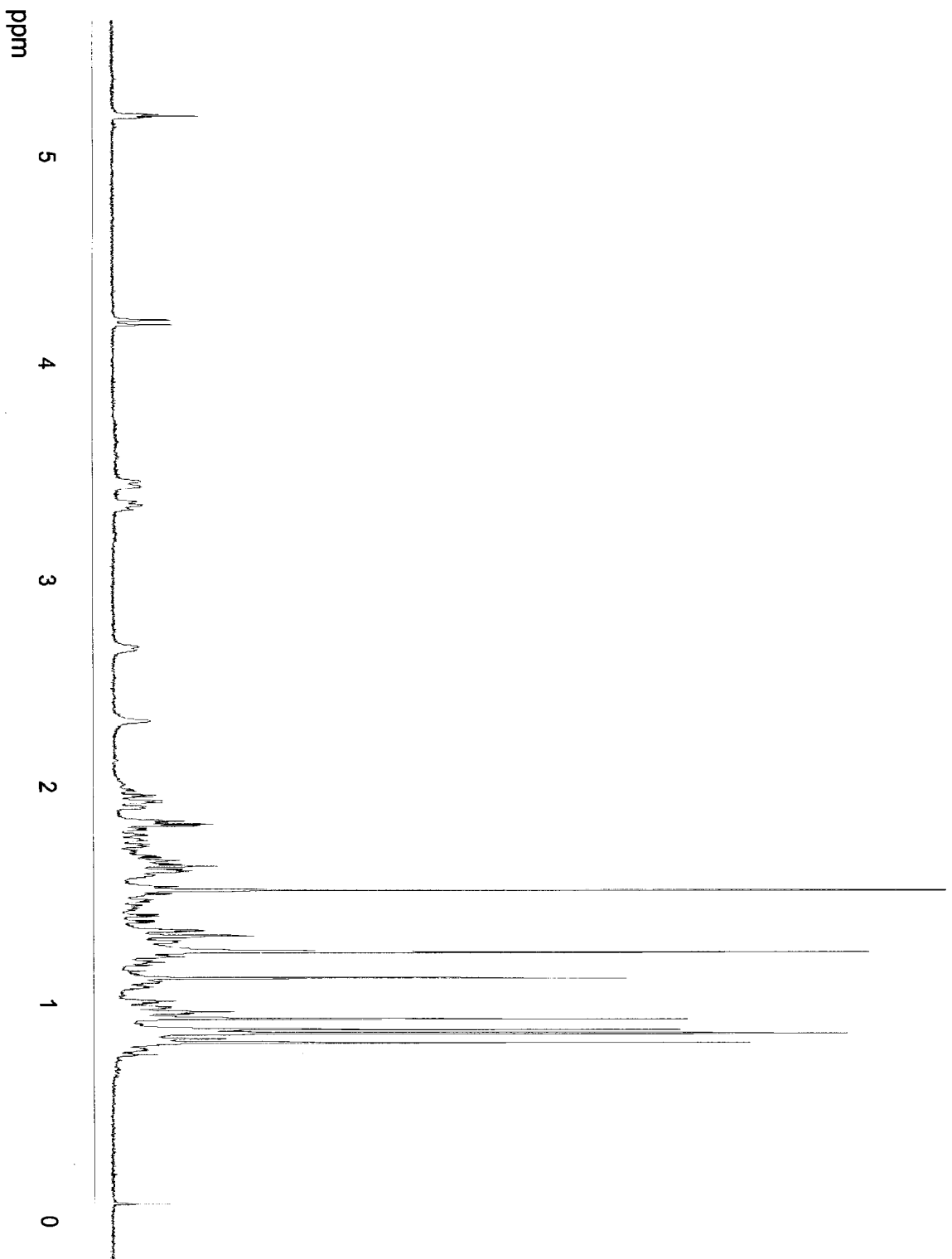
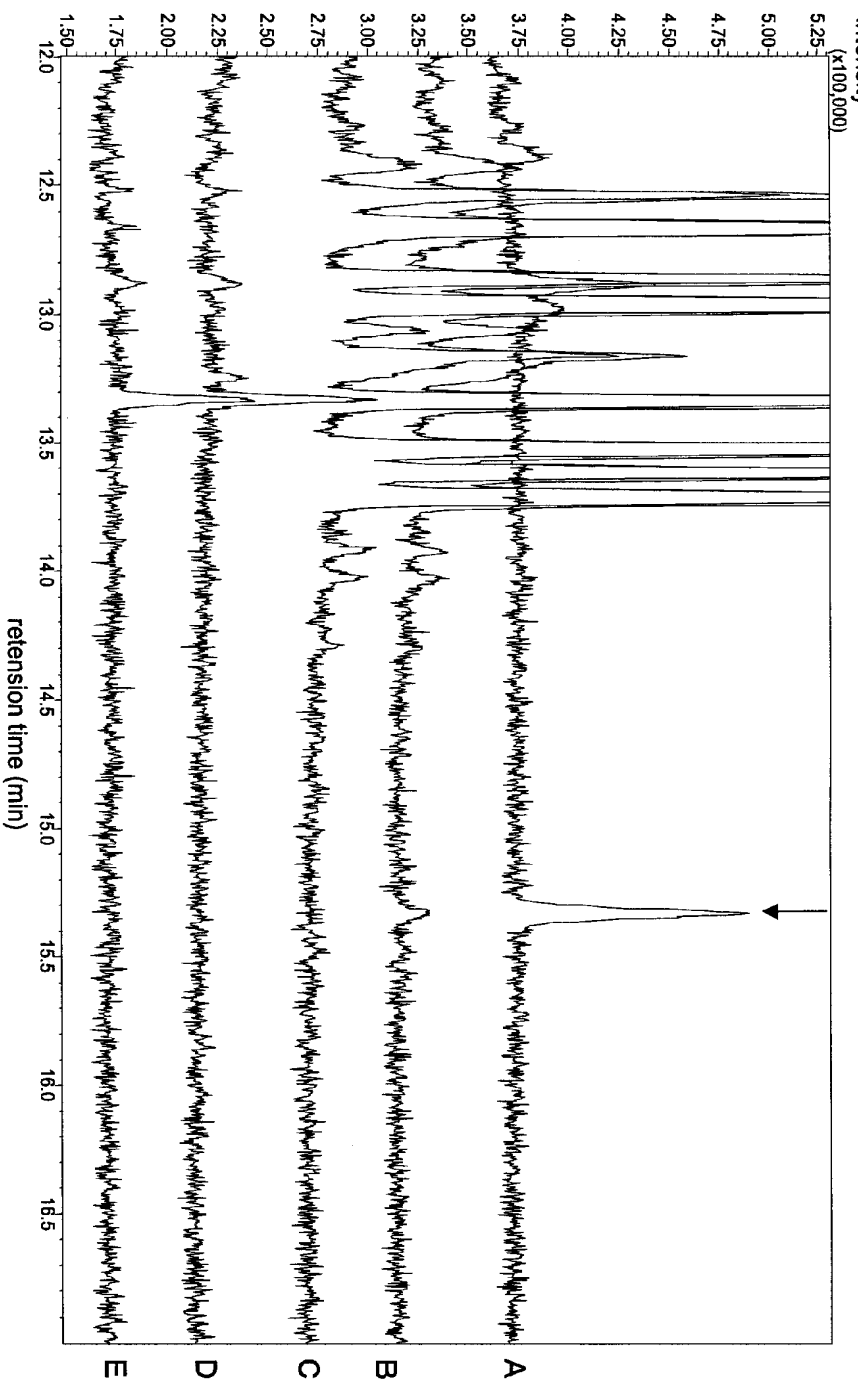


図6 CYP93E1と多機能型トリテルペン合成酵素 (YUP43) の共発現による3β, 24-ジヒドロキシ-12-オレアネンの生産



各形質転換酵母 (GIL77) から得られた脂溶性画分をアセチル化し、GC-MS解析。T1Mによるクロマトグラム。

A; 3β, 24-ジアセトキシ-12-オレアネンの標品 (20 pmol)

B; pESC-YUP43-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物

C; pESC-YUP43による形質転換酵母の抽出物

D; pESC-CYP93E1による形質転換酵母の抽出物

E; pESC-Uraによる形質転換酵母の抽出物

図7-1 CYP93E1の塩基配列

[illegible]

上段：データベースに登録されている塩基配列 (AF135485)。
下段：本実験で増幅したクローンの塩基配列

一致していない塩基を黒枠で示した。(三箇所)の相違)。

図 7-2 CYP93E1 の推定アミノ酸配列

AF135485	1	MDDIKGYLVLEFLWFISTILIRSLFKKKPQRLRPPGPISIPLLGHAPYLRSLHQALYKLSIRYGP LIHVMIGSKHVV	80
this work	1	MDDIKGYLVLEFLWFISTILIRSLFKKKPQRLRPPGPISIPLLGHAPYLRSLHQALYKLSIRYGP LIHVMIGSKHVV	80
AF135485	81	ASSAETAKQILKTSEAFNCNPLMTASESLTYGADYFETPYGTYWRFLKKLCMTELLSGKTLLEHVRIRSEVEAF LKR	160
this work	81	ASSAETAKQILKTSEAFNCNPLMTASESLTYGADYFETPYGTYWRFLKKLCMTELLSGKTLLEHVRIRSEVEAF LKR	160
AF135485	161	MMETSGNGNYEVVMRKELLTHTNNITRMTMGKKSNAENDEVARLRKVVREVGELLGAFNLGDYIGFMRPLDLQGF GKN	240
this work	161	MMETSGNGNYEVVMRKELLTHTNNITRMTMGKKSNAENDEVARLRKVVREVGELLGAFNLGDYIGFMRPLDLQGF GKN	240
AF135485	241	METHHKVDAMMEKVLREHEEARAKEDADSDRKKDLFDILNLI EADGADNKLITRESAKAFALDMP IAGTNGPASVLEWSL	320
this work	241	METHHKVDAMMEKVLREHEEARAKEDADSDRKKDLFDILNLI EADGADNKLITRESAKAFALDMP IAGTNGPASVLEWSL	320
AF135485	321	AELVSNPHVFKKAREEIESVVGKERLVKESDIPNLPLYLQAVLKETLR LHPPTPIEAREAMRTQVEGYDIPENSTI LST	400
this work	321	AELVSNPHVFKKAREEIESVVGKERLVKESDIPNLPLYLQAVLKETLR LHPPTPIEAREAMRTQVEGYDIPENSTI LST	400
AF135485	401	WATGRDPNYWDAL EYKPERFLFSDDPGKSKIDVRGQYYQLLPFGSGRSCPGASTALVMQATLASLIQC FDMI VNDGK	480
this work	401	WATGRDPNYWDAL EYKPERFLFSDDPGKSKIDVRGQYYQLLPFGSGRSCPGASTALVMQATLASLIQC FDMI VNDGK	480
AF135485	481	NHHVDMSEEGRVTVFLAKPLKCKPVPRFTPPAA* 514	
this work	481	NHHVDMSEEGRVTVFLAKPLKCKPVPRFTPPAA* 514	

上段：データベースに登録されている塩基配列（AF135485）の推定アミノ酸配列。
下段：本実験で増幅したクローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列。
一致アミノ酸を黒塗りにした（二箇所 の相違）。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ソヤサポゲノール B は前駆体である β -アミリンの 2 段階の水酸化反応を経て生合成される。しかしながら、この反応に関与する水酸化酵素の遺伝子は明らかにされていなかった。そのため、水酸化酵素についての遺伝子工学的な利用が不可能であった。

【解決手段】 発明者らは、ダイズ由来のシトクローム P 4 5 0 遺伝子 C Y P 9 3 E 1 がオレアナン型トリテルペンの 2 4 位を水酸化する酵素タンパクをコードしていることを明らかにするとともに、当該遺伝子を遺伝子工学的な手段を用いて利用する方法を提供する。

【書類名】	手続補正書
【提出日】	平成16年 4月 7日
【あて先】	特許庁長官殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2004- 49123
【補正をする者】	
【識別番号】	000006091
【氏名又は名称】	明治製菓株式会社
【代表者】	佐藤 尚忠
【電話番号】	03-3273-3357
【手続補正1】	
【補正対象書類名】	特許願
【補正対象項目名】	提出物件の目録
【補正方法】	追加
【補正の内容】	
【提出物件の目録】	
【物件名】	受託証写 1

【物件名】

受託証写

【添付書類】

1 167

複 写

書式7(第7条関係)

受 託 証

通知番号 : 15 産生寄 第 1870 号

通知年月日 : 平成 16 年 2 月 6 日

明治製菓株式会社
取締役社長 佐藤 尚忠

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
GIL77/pESC・PSY・CYP93E1	FERM P- 19675
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質	
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 16 年 2 月 6 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

出願人履歴

0 0 0 0 0 6 0 9 1

19900803

新規登録

東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 1 6 号

明治製菓株式会社